

学校编码: 10384

学号: 20520061151965

分类号_____密级_____

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

胆固醇和蛋白质对模拟细胞膜的
稳定性影响研究

Study on the Effect of Cholesterol and BSA on
the Stability of Simulated Cell Membrane

蓝 琴

指导教师姓名: 韩 国 彬 教授

专 业 名 称: 物 理 化 学

论文提交日期: 2009 年 06 月

论文答辩时间: 2009 年 06 月

学位授予日期: 2009 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2009 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(厦门大学化学化工学院化学系物理化学专业胶体与界面化学)课题(组)的研究成果,获得(胶体与界面化学)课题(组)经费或实验室的资助,在(韩国彬教授)实验室完成。

声明人(签名):
年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ☒ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 前言.....	1
1.1 囊泡.....	1
1.1.1 囊泡的制备.....	2
1.1.2 囊泡的性质.....	3
1.1.3 囊泡的表征.....	3
1.2 细胞膜模拟.....	4
1.2.1 细胞膜模拟概述.....	4
1.2.2 细胞膜模拟系统.....	5
1.2.3 生物膜模拟模型.....	6
1.3 本论文研究的目的和意义.....	7
第二章 理论部分.....	9
2.1 单分子膜.....	9
2.1.1 单分子膜的 π -A 等温曲线.....	9
2.1.2 混合膜表面过剩面积及相关参数.....	11
2.2 囊泡的破坏.....	12
2.2.1 表面活性剂的影响.....	13
2.2.2 温度的影响.....	13
2.2.3 pH 的影响.....	14
2.3 DLVO 理论.....	16
2.4 化学弛豫法在表面活性剂研究中的应用--胶束化动力学.....	17
2.4.1 Aniansson 和 Wall 处理方法的基本假设.....	17
2.4.2 交换过程弛豫时间的表达式.....	19
2.4.3 胶束形成-破坏的弛豫时间表达式.....	19
2.5 实验设计.....	20
第三章 实验部分.....	22
3.1 试剂.....	22
3.2 仪器.....	24
3.2.1 仪器的使用.....	24

3.2.2 主要仪器及其工作原理.....	25
3.3 实验方法.....	28
3.3.1 卵磷脂囊泡的制备.....	28
3.3.2 单分子膜 π -A 等温线的测定.....	29
3.3.3 Zeta 电位的测定.....	30
3.3.4 停流法研究表面活性剂对卵磷脂囊泡的破坏.....	30
3.3.5 负染色法透射电镜.....	31
第四章 胆固醇对卵磷脂囊泡稳定性的影响.....	32
4.1 单分子膜的 π -A 等温线.....	32
4.2 胆固醇对囊泡体系的 Zeta 电位的影响.....	33
4.3 浊度的测定及活化能计算.....	34
4.3.1 纯卵磷脂囊泡体系.....	34
4.3.2 含胆固醇的卵磷脂囊泡体系.....	36
4.4 透射电镜观测结果.....	38
4.5 小结.....	40
第五章 BSA 对卵磷脂囊泡稳定性的影响.....	41
5.1 单分子膜的 π -A 等温线.....	41
5.2 BSA 对囊泡体系的 Zeta 电位的影响.....	43
5.3 浊度的测定及活化能计算.....	44
5.4 透射电镜观测结果.....	46
5.5 小结.....	48
第六章 两种体系的比较.....	49
6.1 混合单分子膜的 π -A 等温线.....	49
6.2 Zeta 电位的比较.....	49
6.3 浊度的比较.....	49
6.4 小结.....	51
第七章 总结.....	52
参考文献.....	53
攻读硕士期间发表论文.....	61
致谢.....	62

Contents

Abstract.....	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Vesicle.....	1
1.1.1 Preparation of Vesicle.....	2
1.1.2 Properties of Vesicle.....	3
1.1.3 Characterization of Vesicle.....	3
1.2 Simulation of Cell Membrane.....	4
1.2.1 Overview of Cell Membrane Simulation.....	4
1.2.2 Cell Membrane Simulation System.....	5
1.2.3 Model of Biological Membrane Simulation.....	6
1.3 The Significance of this Article.....	7
Chapter 2 Theory.....	9
2.1 Monolayer.....	9
2.1.1 π -A Isotherm of Monolayer.....	9
2.1.2 Excess Area and Relative Parameters of mixed films.....	11
2.2 Vesicle Breakdown.....	12
2.2.1 Influence of Surfactant.....	13
2.2.2 Influence of Temperature.....	13
2.2.3 Influence of pH.....	14
2.3 Theory of DLVO.....	16
2.4 The Application of CRM in Surfactants Research-Micellization Kinetics.....	17
2.4.1 Basic Assumption of Aniansson-Wall Method.....	17
2.4.2 Relaxation Time for the Exchange Process.....	19
2.4.3 Relaxation Time for the Micelle Formation-Breakdown.....	19
2.5 Experiment Design.....	20
Chapter 3 Experiment.....	22
3.1 Materials.....	22
3.2 Instruments.....	24
3.2.1 Instruments Used.....	24
3.2.2 Instruments' Principle.....	25
3.3 Methods of Experiment.....	28

3.3.1 Preparation of Lecithin Vesicle.....	28
3.3.2 Measurements of π -A Isotherm.....	29
3.3.3 Measurements of Zeta-potential.....	30
3.3.4 Surfactants adsorption on Vesicle Researched by Stopped-flow.....	30
3.3.5 Negative-Staining TEM.....	31
Chapter 4 Effect of Cholesterol on the Stability of Lecithin Vesicle...	32
4.1 π -A Isotherm of Monolayer.....	32
4.2 Effect of Cholesterol on the Zeta-potential of Lecithin Vesicle.....	33
4.3 Measurement of Turbidity and Calculation of Activation Energy.....	34
4.3.1 System of Pure Lecithin Vesicle.....	34
4.3.2 System of Lecithin Vesicle Mixed with Cholesterol.....	36
4.4 Observation of TEM.....	38
4.5 Conclusions.....	40
Chapter 5 Effect of BSA on the Stability of Lecithin Vesicle.....	41
5.1 π -A Isotherm of Monolayer.....	41
5.2 Effect of BSA on the Zeta-potential of Lecithin Vesicle.....	43
5.3 Measurement of Turbidity and Calculation of Activation Energy.....	44
5.4 Observation of TEM.....	46
5.5 Conclusions.....	48
Chapter 6 Comparison of Two Systems.....	49
6.1 Comparison of π -A Isotherm.....	49
6.2 Comparison of Zeta-potential.....	49
6.3 Comparison of Turbidity.....	49
6.4 Conclusions.....	51
Chapter 7 Conclusions.....	52
References	53
Acknowledgements	62

摘 要

细胞膜一般是由 40-50%的磷脂、糖脂等类脂和 50-60%的蛋白质组成。双分子层、囊泡、胶束等常用做研究细胞膜的膜模拟剂。囊泡是由两个双亲分子定向单层尾对尾地结合成封闭单分子双层所构成的外壳，和壳内包藏的微水相构成。它可分为两种类型：由天然的或合成的磷脂所组成的囊泡（脂质体）和由双亲分子自组装形成的囊泡。囊泡由于制备相对简单，对脂质体进行修饰，可以使其获得某些与生物体相似的性质，因此囊泡是研究和模拟生物膜的最佳体系。

Gemini表面活性剂是由联接基以共价键将两个两亲分子单体联接而成的，它代表了一类新型表面活性剂。大量的研究表明联接基的性质（长度、柔韧性和化学结构）最终决定了Gemini表面活性剂在溶液中的性质。因而在学术上以及工业上，都对它产生浓厚的兴趣。本文所研究的季铵盐型Gemini表面活性剂是以 $(CH_2)_s$ 为联接基的季铵盐型Gemini表面活性剂。

本文以卵磷脂形成的囊泡模拟细胞膜，以 Tris 缓冲体系模拟细胞膜所处的环境，并根据细胞膜的组成添加胆固醇和蛋白质以构建一种模拟细胞膜的模型。实验通过 LB 膜分析仪研究胆固醇、卵磷脂、牛血清蛋白（BSA）在气-液界面的行为及相互作用力，并结合停流装置、动态光散射技术和透射电子显微镜等方法研究 Gemini 表面活性剂破坏卵磷脂囊泡的过程，以及胆固醇、BSA 对卵磷脂囊泡稳定性的影响。论文的研究主要分为两部分：

第一部分是胆固醇对卵磷脂囊泡稳定性的影响。混合单分子膜的过剩面积小于零表明胆固醇和卵磷脂是相互吸引的。Zeta 电位的测量也说明带正电的胆固醇和带负电的卵磷脂之间存在相互吸引的静电作用力。动力学结果表明胆固醇的添加使卵磷脂囊泡更不易被 Gemini 表面活性剂破坏，这是因为：表面活性剂嵌入到囊泡的双分子层中，与带负电的卵磷脂囊泡发生静电作用，从而使囊泡结构的双分子层厚度改变，胆固醇的加入，与卵磷脂的极性头部和脂肪酸尾部发生作用，使卵磷脂囊泡的双分子层更加密集，并使囊泡表面的负电性减弱，不利于双子表面活性剂在囊泡表面的吸附和嵌入。

第二部分是 BSA 对卵磷脂囊泡稳定性的影响。在不同比例下，混合单分子膜的过剩面积都小于零，表明 BSA 和卵磷脂是相互吸引的。Zeta 电位的测量显示 BSA 的加入对卵磷脂囊泡的表面电位没有多大影响，说明 BSA 和卵磷脂之间

是疏水作用起主导而不是静电作用。动力学结果表明 BSA 的加入使卵磷脂囊泡更不易被 Gemini 表面活性剂破坏,这是因为 BSA 与卵磷脂囊泡具有疏水相互作用,BSA 能够定位于卵磷脂囊泡膜相中,而 BSA 在膜相中的定位使囊泡膜相的疏水性降低,这样 Gemini 表面活性剂更不易进入到囊泡的双分子层中。

关键词: 卵磷脂囊泡; 混合单分子膜; 膜模拟

Abstract

Cell membrane is made up of 40-50% lipid and 50-60% protein. Bilayer, vesicle and micelle are general membrane simulation regents. Vesicle is composed of crust which forms from closed unimolecule-bilayer that combined with monolayers of two amphiphilic molecules in tail-to-tail orientationally, and micro-hydrofacies that is contained within the crust. It can be sort into two types: liposome made up of natural or complex lecithin and vesicle made by self assembly of amphiphilic molecules. Because of simple preparation, as well as something can be done to liposome, vesicle is the best system to study and simulate biologic membrane.

Gemini surfactants are made up of two amphiphilic moieties covalently connected by a spacer group, and represent a new class of surfactants. According to lots of papers, the nature of the spacer group(length, flexibility, chemical structure) has been shown to be of the utmost importance in determining the solution properties of aqueous Gemini surfactants. So they are attracting considerable interest in the academic and industrial communities working on surfactants. In this article, we study a kind of Gemini surfactants-quaternary ammonium Gemini connected by the space chain of $(CH_2)_s$.

In this article, we constructed a cell membrane simulation model by adding cholesterol and BSA to lecithin vesicle. The mechanism of structure transform of vesicle was explored through TEM. The mixed monolayers at the air/water interface were investigated using Langmuir balance technique. We also researched the effect of cholesterol and BSA on the structure transform of lecithin vesicle by the methods of kinetic and dynamic light-scattering. There are two sections in this article:

Firstly, we study the effect of cholesterol on the stability of lecithin vesicle. The negative excess area of the mixed monolayer and the experiment of Zeta potential showed that there was mutual attraction between cholesterol and lecithin. The kinetic result also showed that cholesterol could stabilize lecithin vesicle. The reason was that positively charged Gemini surfactant intercalated into the bilayer of negatively charged lecithin vesicle and reduced the thickness of bilayer of lecithin vesicle. The positively charged cholesterol could decrease the surface negative potential and influence Gemini surfactant insert into the surface of vesicle.

Secondly, we study the effect of BSA on the stability of lecithin vesicle. The

negative excess area of the mixed monolayer and the experiment of Zeta potential showed that the main force between BSA and lecithin vesicle was hydrophobic interaction rather than electrostatic interaction. The kinetic result showed that lecithin vesicle mixed with BSA was harder to be disrupted by Gemini surfactant. The reason was that the hydrophobic interaction between BSA and lecithin vesicle helped BSA located in the bilayer of vesicle, which decreased the hydrophobicity of the bilayer. So it was more difficult for Gemini surfactant to enter into the bilayer of vesicle, which meant that it was more difficult to disrupt lecithin vesicle.

Keywords: Lecithin vesicle; Monolayer; Membrane simulation

第一章 前言

1.1 囊泡

囊泡(vesicle)是表面活性剂分子在水溶液中形成的具有封闭双层结构的分子有序组合体之一^[1]。由天然磷脂所形成的囊泡通常也称为脂质体(liposome)。一般囊泡由两亲分子进行定向单层疏水基对疏水基的结合构成封闭性双层外壳,其壳内包藏着微水相,从结构上看可分成两类,即单室和多室囊泡(见图1.1)。单室囊泡只有一个封闭双层包裹着水相,多室囊泡则由多个双亲分子封闭双层成同心球式的排列,不仅中心部分而且各个双层之间都包含水^[2]。



图 1.1 单室囊泡 (A) 与多室囊泡 (B)

囊泡的形状多为大致球形、椭球形或扁球形,也曾观察到管状囊泡^[3]。囊泡的大小一般为30nm~1 μ m,据报道,也有达到20 μ m的巨型囊泡^[4-5]。由于囊泡与细胞膜的结构非常相似,所以一直作为生物膜模型和发展仿生技术的模拟体系而得到广泛的研究^[6]。化学家则为囊泡所能提供的多种特定的反应环境所吸引,希望通过它来实现和控制某些化学反应。囊泡可将亲水溶质包容在它的中心部位及极性基层之间的区域,疏水溶质则在各个两亲分子双层的碳氢基夹层之中,这就使对环境极性有不同要求的成分各得其所,而且有相互接触进行反应的机会。图1.2是一个单室囊泡及其所能提供的九个反应环境的示意图^[7-8]。

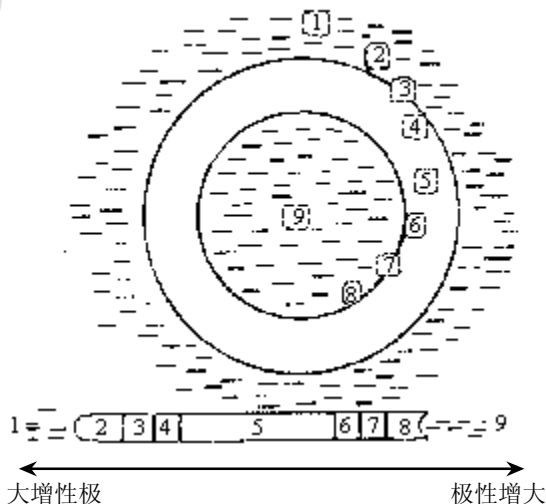


图 1.2 囊泡溶液的 9 个区域

图下方标注各区域极性大小,区域 5 的极性最小

脂质体是人类最早发现的囊泡体系。Stoeckenius^[9]在 1959 年发现磷脂在水中会溶胀形成多层结构。1965 年Bangham等^[10]将干磷脂分散于水中制得了多室囊泡,这标志着人工制备囊泡研究的开始。1977 年Kunitake等^[11]首次以全人工合成表面活性剂——双十二烷基二甲基溴化铵制得了囊泡,带动了这一方面研究工作的迅速发展。从此,囊泡便在生命科学及许多高新技术领域的研究中扮演着重要角色。

1.1.1 囊泡的制备

囊泡的制备一般包括三个步骤:首先是脂质体原料的水合和非均质囊泡的形成,然后将囊泡均质化,最后将脂质体分离或分散到相应的介质中。制备囊泡的方法有多种,比较传统的有溶胀法、注射法和超声法。

(1) 溶胀法

溶胀法^[12]是最简单的制备囊泡的方法,它是让双亲化合物在水中溶胀,自发形成囊泡。例如,将磷脂溶液涂于锥形瓶内壁,待溶剂挥发后形成磷脂膜附着在瓶上。然后加水于瓶中,磷脂膜便自发卷曲,形成囊泡进入溶液中。

(2) 注射法

将成膜类脂物质及脂溶性物质(如药物)共溶于有机溶剂中(乙醇或乙醚),然后将此溶液用注射器缓慢加入到50~60℃的缓冲溶液中,不断搅拌至溶剂全部蒸发为止,即可制得脂质体。由这两个方法制备成多室囊泡和(或)单室囊泡。在相变温度以上时,对多层囊泡进行超声,则形成单室囊泡,其直径为30~60 nm,囊泡的壁厚一般为5 nm 左右,每个囊泡含有80000~100000 个表面活性剂分子。

注射法中常使用乙醚、氯仿和乙醇来溶解两亲化合物,因而有乙醚注射法、氯仿注射法和乙醇注射法。本文制备囊泡的方法就是采用乙醇注射法,将两亲化合物(本文为卵磷脂)制成乙醇溶液,然后注射到水中,待乙醇挥发后就可以形成囊泡。相反的操作也是可以的,即将水注射到到磷脂的乙醇溶液中,再除去乙醇,也能制备囊泡。

(3) 超声法

有的双亲分子不能自发形成囊泡,但可以在超声条件下形成。这样制备的囊泡多为大小不一的多室囊泡。将其压过孔径由大到小的系列聚碳酸酯膜,可以得到尺寸较小和分散性较好的多室囊泡。另外,多室囊泡经凝胶过滤或经挤压小孔可得到单室囊泡^[2]。

脂质体制备过程中应注意几个问题^[13]：首先，应注意脂质体的稳定性，脂质体的稳定性与膜质材料的相转变温度有密切的联系，氢化卵磷脂比不饱和卵磷脂有更高的相转变温度，因而制得的脂质体稳定性好。其次，不同制备方法制得脂质体形状和大小均不同。用溶胀法制得的是多层脂质体，经过凝胶过滤或经挤压过小孔，可以得到尺寸较小和多分散性较小的多室囊泡^[14]甚至单室囊泡^[15]，但是这样一来，将导致囊泡组分的流失；注射法的条件温和，易制得完整，单分散的单室大脂质体，但残余溶剂较难除尽；超声法制得的脂质体容易出现结构缺陷。另外，在制备的过程中，还要解决脂质体的富集与分离和脂质体的分析等问题。

1.1.2 囊泡的性质

(1) 稳定性

囊泡分散液与胶团溶液不同，它不是均匀的平衡体系，而是表面活性剂的有序组合体在水中的分散体系，其分散相的尺寸在胶体分散的范围。它只是具有暂时的稳定性，有的可以稳定几周，甚至几个月。这是因为形成囊泡的物质在水中的溶解度很小，迁移的速度很慢。而且，相对于层状结构，囊泡结构具有熵增加的优势。已经发现，多室囊泡越大越稳定。有时也可以采用可聚合的表面活性剂，在形成囊泡后进行聚合，以增强囊泡的稳定性^[16]。

(2) 包容性

囊泡的一个重要特性是能够包容多种溶质。它可以按照溶质的极性把它们包容在不同部位^[17]（如图 1.2）。一般地，较大的亲水溶质包容在它的中心部位。小的亲水溶质包容在它的中心部位及极性基层之间的区域，即各个“水室”之中。疏水溶质则在两亲分子双层的碳氢链夹层之中。本身就具有两亲性的分子，例如胆固醇、脂蛋白之类的化合物，可插到定向的双层中形成混合双层。这种包容作用是囊泡多种应用的基础，能使囊泡具有同时运载水溶性和非水溶性药物的能力。

1.1.3 囊泡的表征^[18]

囊泡的表征有很多方法，如透射电镜、光散射法、葡萄糖捕获法以及流变学方法等。

(1) 透射电镜

透射电镜是最直观的一种方法，利用这种方法可以直接得到各种囊泡的照

片，其缺点是费用高且操作复杂。

(2) 光散射法

光散射法的操作相对简单得多，它分为静态光散射和动态光散射，可以与透射电镜相结合，在确认囊泡存在的前提下，准确地给出其半径，并可以跟踪监测其变化。在越来越多的自发形成囊泡的报道情况下，光散射可以通过粒径的变化确认囊泡的存在。

(3) 葡萄糖捕获法

葡萄糖捕获法可以测定出囊泡的增容量。

(4) 流变法

流变法可以通过胶束、囊泡和虫状胶束流变性质的差别反映其结构的变化。

1.2 细胞膜模拟

1.2.1 细胞膜模拟概述

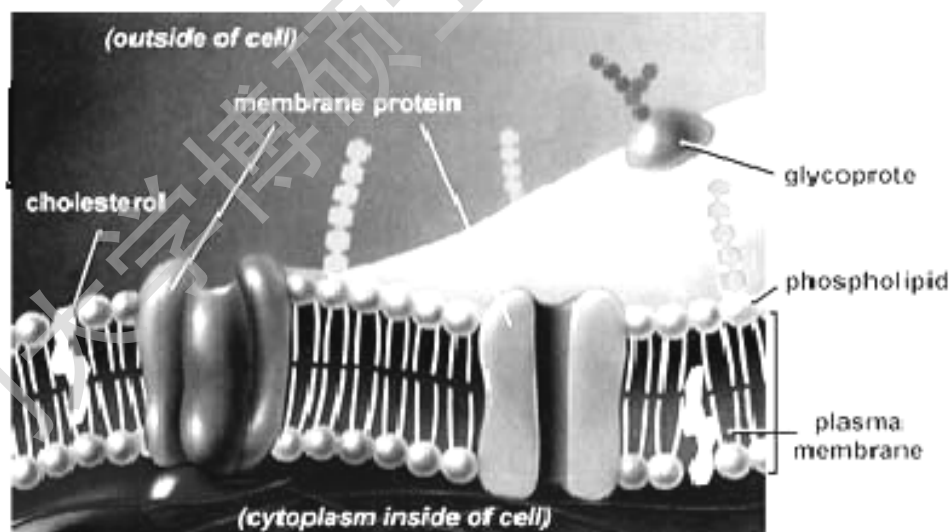


图 1.3 流体镶嵌型的生物膜模型

细胞膜一般是由 40-50%的磷脂、糖脂等类脂和 50-60%的蛋白质组成。生物膜是细胞内膜和细胞外膜的统称，此外还包括高等动物体内的复合膜。按照 Singer和Nicolson提出的流体镶嵌模型^[19]（见图 1.3），由磷脂和糖脂等类脂构成的双分子层是生物膜的基本骨架，而蛋白质则包埋于磷脂基质中，可以从两侧表面嵌入或穿透整个双层分子，起着渗透屏障的作用。双分子层的每个磷脂分子都

可以自由横向移动,其结果使双分子层具有流动性、柔韧性、高电阻性及对高极性分子的不通透性。因此,生物膜结构不是僵硬、静止的,而是动态、流动的结构^[20]。

膜模拟化学主要研究胶束、单分子层、双分子层、囊泡、主-客体系和聚离子等有序组合体的特性和应用,是近年来迅速发展起来的一门新兴科学,是化学、物理学、生物学基础边缘学科和多种工程技术的汇合点。早在 60 年代初,Muller.P 等人^[21]在水溶液成功形成自组装平板类脂双层膜(planar bilayer lipid membrane, 简称BLM膜),这种膜与细胞膜的组成和结构相似,因此可作为细胞膜的模型用于各种研究。BLM膜与后来相继出现的各种模拟细胞膜(包括LB膜,支撑的BLM膜)为我们提供了研究细胞膜的有效手段。进行细胞膜模拟的研究具有如下意义:

第一,有助于认识许多生命现象,对膜结构的认识还可为物理学的发展作新的启迪。

第二,研究在比较简单的体系中模拟膜为媒介的过程,并以此为基础,开发这种新型化学的实际应用。我们可以利用胶束、单分子层、双分子层、囊泡、主-客体系和聚离子这些统称为膜模拟剂的物质来组成底物、改变微环境和反应性、以及用作载体。目前已经应用于反应性控制、光化学太阳能的转换和贮存、分子的识别和输运、药物胶囊化、以及为底物和酶提供独特的环境^[12]。如今,随着膜模拟化学的发展,反胶束、囊泡和聚离子等还广泛应用于制备各种结构的纳米功能材料中^[22]。

1.2.2 细胞膜模拟系统

膜模拟剂分为两类:(1)由表面活性剂组成,起主体作用;(2)在聚合物主干上有电离基团。其中由表面活性剂和磷脂等两亲分子在溶剂中分散、聚集的分子有序体占主要部分,其各组合有序体的组织结构如图 1.4 所示。图中各种结构都是简单化了的。实际上,目前还没有一个模型能完美到如实地模拟出复杂膜集合体。表面活性剂是由疏水和亲水两部分组成的两亲分子。极性头基之间的排斥和碳氢链之间的缔合的相反力导致表面活性剂在水中的聚集。当水溶液中表面活性剂的浓度超过临界胶束浓度(cmc)就在溶液中形成胶束,随着浓度增加依次形成球状胶束、棒状胶束和液晶相;在非水溶剂中,若有痕量水存在,表面活性剂之间的偶极-偶极及离子对相互作用的结果形成反胶束。若增加水的浓度,将形成较大的聚集体。如果水的浓度进一步增加,开始出现油包水微乳。将表面活性

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库